

**ÜBER DEN TRANSPORT VON DICARBONSÄUREN
DURCH DIE INNERE MEMBRAN VON
SPINATCHLOROPLASTEN**

Karl Lehner

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ÜBER DEN TRANSPORT VON DICARBONSÄUREN DURCH DIE
INNERE MEMBRAN VON SPINATCHLOROPLASTEN

Aus dem
INSTITUT FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE, PHYSIKALISCHE BIOCHEMIE
UND ZELLBIOLOGIE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstände: Prof. Dr.Dr.h.c. Th. Bücher - Prof. Dr. E.M.
Klingenberg - Prof. Dr. F. Miller -
Prof. Dr. H.G. Zachau

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karl Lehner

aus
Regensburg

Jahr
1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. W. Heldt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. M. Klingenberg

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.07.1976



Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H.W. Heldt,
danke ich herzlichst für die Überlassung des Themas
und die fachkundige Anleitung auf experimentellem und
theoretischem Gebiet.

Frau S.Soboll danke ich für die Durchführung der
enzymatischen Tests.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

2. METHODISCHER TEIL

2.1. Präparation und verwendete Radioisotope

2.2. Technik der Silikonölfiltrationszentrifugation

2.3. Bestimmung der Räume

2.4. Methodik der vier Experimenttypen

2.4.1. Typ A

2.4.2. Typ B

2.4.3. Typ C

2.4.4. Typ D

2.5. Messung der Temperaturabhängigkeit

2.6. Dünnschichtradiographie

3. ERGEBNISSE

3.1. Kinetik des Dicarbonsäuretransportes

3.2. Enzymatische Konstanten K_m und V_{max}

3.3. Konkurrenz der Dicarbonsäuren

3.4. Spezifität des Transportenzyms

3.5. Gegentauch

3.6. Freisetzung der Dicarbonsäuren

ohne Aufnahme = Leakage

3.7. Temperaturabhängigkeit

4. DISKUSSION

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

Chloroplasten sind der Ort der pflanzlichen Photosynthese. Sie bilden ein separates Stoffwechselkompartiment innerhalb der Zelle. Die Koordination der Stoffwechselabläufe in den Chloroplasten und im Cytosol erfordert einen gezielten Stoffaustausch über die beide Kompartimente voneinander trennende Chloroplasten-Hülle.

Diese besteht aus zwei Membranen (Abb. 1).

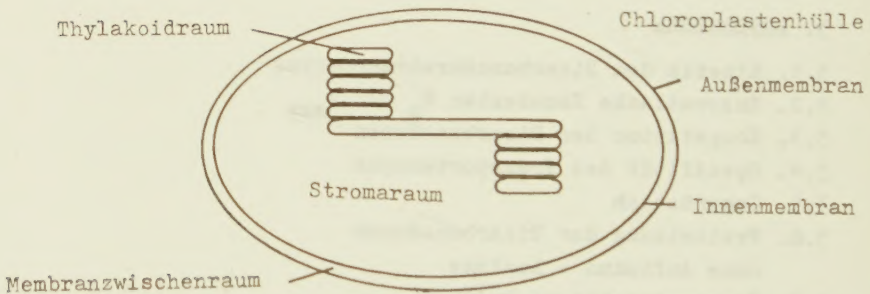


Abbildung 1 - Schematischer Aufbau eines Chloroplasten

Die äußere Membran ist für niedermolekulare Substanzen wie Sorbit, Saccharose, Phosphat, Nucleotide und Dicarbonsäuren frei permeabel.

Hingegen ist die Innenmembran für diese Substanzen nicht

permeabel; sie bildet die eigentliche funktionelle Grenze zwischen Stromaraum und Cytosol (Heldt und Sauer, 1971). Da die Innenmembran für tritiiertes Wasser permeabel ist, läßt sich der von der Innenmembran umgebene Raum funktionell als Sorbit-impermeabler $^3\text{H}_2\text{O}$ -Raum bestimmen. Dieser umfaßt den Stromaraum und den Thylakoidraum. Der Thylakoidraum weist wahrscheinlich keine direkte und freie Verbindung zum Außenraum auf. Dies folgt aus der Beobachtung, daß in intakten Chloroplasten ein hoher pH-Gradient zwischen dem Thylakoidraum und dem Stromaraum aufrechterhalten wird.

Der Anteil des Thylakoidraums am Sorbit-impermeablen Raum beläuft sich auf etwa 12% (Heldt et al. 1973). Die berechnete Metabolitkonzentration im Sorbit-impermeablen Raum dürfte daher in den meisten Fällen der tatsächlichen Stromakonzentration sehr nahe kommen.

In den letzten Jahren konnten der Innenmembran drei Carrier zugeordnet werden, die den Transport wichtiger Metabolite über die impermeable Membran ermöglichen: der Adeninnucleotid- (Heldt 1969), Phosphat- und Dicarboxylatcarrier (Heldt und Rapley 1970). Für letzteren wurde bisher gezeigt, daß er den Transport verschiedener Dicarbonsäuren wie Aspartat, Glutamat und Malat ermöglicht.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Eigenschaften des Dicarbonsäurecarriers im Detail zu erkunden. Dazu wurde der Dicarbonsäuretransport über die Innenmembran gemessen. Der Transport in den Sorbit-impermeablen Raum wurde als Aufnahme, der Transport vom Stroma ins Medium als Freisetzung bezeichnet.

2. METHODISCHER TEIL

2.1. Präparation und verwendete Radioisotope

Die Spinatblätter wurden unter Beachtung einer kurzen Lagerzeit und günstigen Zustandes auf dem Markt gekauft oder aus eigener Zucht geerntet. Die Isolierung der Chloroplasten erfolgte nach der Methode von Cockburn et alii (1962) - modifiziert nach Heldt und Sauer (1971). Das hier und später während des Experiments verwendete Medium, bestehend aus Sorbit 0,33 M, N-2 Hydroxypiperazin-N-2-äthansulfonsäure (HEPES) 50mM, $MnCl_2$ 1mM, $MgCl_2$ 1mM und EDTA 2mM, war mittels NaOH auf eine pH von 7,0 eingestellt.

Die Prüfung der Chloroplastensuspension mit dem Phasenkontrastmikroskop (Leech 1966) ergab, daß 70-90% der Chloroplasten intakt waren. Der Chlorophyllgehalt der verwendeten Suspension wurde nach der Methode von Whatley und Arnon (1963) bestimmt.

Folgende radioaktive Substanzen wurden verwendet:

L-(^{14}C)-Malat, (2,3 - ^{14}C)-Succinat, (1,4 - ^{14}C)-Fumarat, L-(^{14}C)-Aspartat, L-(^{14}C)-Glutamat von Amersham, Braunschweig sowie (2,3 - $^3H(N)$)-L-Aspartat, (3H)-Succinat, 5,5 - Dimethyloxazolidine (2,4 - Dione-2- ^{14}C) = (2 - ^{14}C)-DMO und (^{14}C)-Sorbit von New England Nuclear, Boston. Die ^{14}C -markierten Isotopen wurden in einer spezifischen Aktivität zwischen 2000 und 9000 dpm/nMol eingesetzt; die 3H -Isotopen in einer spezifischen Aktivität von 40 000 bis 240 000 dpm/nMol.

2.2. Technik der Silikonölfiltrationszentrifugation:

Die experimentellen Transportvorgänge wurden mittels Silikonöl-Filtrationszentrifugation beendet. Die Methode wurde durch Klingenberg und Pfaff (1967), sowie Heldt und Sauer (1971) angegeben:

In Polypropylen- oder Polyäthylenröhrchen mit 0,4 ml Volumen (W. Sarstedt, Nürnberg-Rommelsdorf) werden 20µl 1 M HClO_4 gegeben und nach kurzer Zentrifugation eine Schicht von 70µl Silikonöl (Wacker Chemie, München, AR 100) darüber gebettet. Nach Zugabe von 300µl Chloroplastensuspension lagert diese auf der Silikonölschicht. Die Chloroplasten werden nun mittels einer Beckmann-Mikrozentrifuge, die ihre maximale Geschwindigkeit binnen einer Sekunde erreicht, in die Perchlorsäure zentrifugiert und dabei denaturiert (Abb. 2).

Technik der Silikonfiltrationszentrifugation

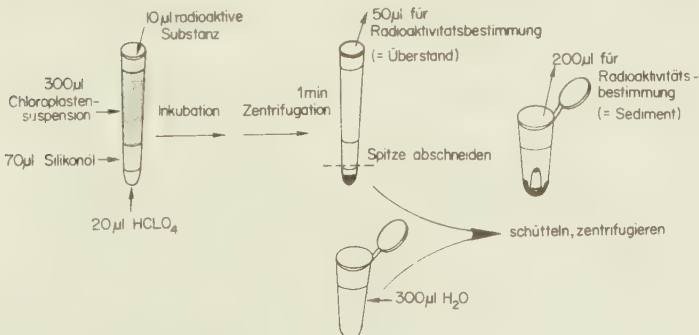


Abbildung 2 - Technik der Silikonölfiltrationszentrifugation (Nach Werdan - Dissertation 1975)

Dieser Trennungsvorgang der Chloroplasten vom Medium ist innerhalb von ca. 2 Sekunden nach Beginn der Zentrifugation abgeschlossen.

2.3. Bestimmung der Räume:

2.3.1. Experimentelle Anordnung:

Zur Berechnung der Substrataufnahme müssen im abgetrennten Chloroplastenzentrifugat drei Räume unterschieden und bestimmt werden:

Der Wasser-Raum ist identisch mit dem Gesamtraum und umfaßt das ganze Chloroplastenvolumen und das mitgerissene Medium. Der Wasserraum wird mit tritiiertem Wasser bestimmt (^3HHO).

Der Sorbit-Raum umfaßt das Volumen des mitgerissenen Mediums und das Volumen des Intermembranraumes. Er wird mittels ^{14}C -Sorbit bestimmt.

Der Sorbit-impermeable Raum setzt sich aus Thylakoid- und Stromaraum zusammen und ergibt sich durch Abzug des Sorbit- vom Wasserraum.

Bei der Bestimmung der Räume wird folgendermaßen vorgegangen:

Nach der Präparation werden die Chloroplasten im Medium suspendiert ($10\text{--}100\text{ }\mu\text{gChlorophyll/ml}$), welches tritiiertes Wasser mit einer spezifischen Aktivität von 10^{-4} Ci/Mol enthält. Jeweils $300\text{ }\mu\text{l}$ dieser Suspension werden in ein Polyäthylenröhrchen abgefüllt (Abb. 2) und mit $10\mu\text{l}$ ^{14}C -Sorbit ($0,1\text{ }\mu\text{Ci}$) für 3 Minuten bei 4°C inkubiert. Dann erfolgt der Stop durch einminütige Zentrifugation.

2.3.2 Weiterverarbeitung und Radioaktivitätsmessung:

Zur Radioaktivitätsmessung werden vom Überstand 50µl entnommen. Darauf wird die Spitze des Röhrchens knapp über der Perchlorsäureschicht in der Ölschicht abgeschnitten und in ein mit 300µl gefülltes Mikroreaktionsgefäß (1,5ml, Fa. Netheler & Hinz, Hamburg) gegeben. Nach maschinellem Schütteln und Zentrifugation werden 200µl des Überstandes zur Radioaktivitätsmessung des Sediments entnommen.

Alle Messungen (^{14}C -Einfach-, ^{14}C - ^3H -, ^{14}C - ^{32}P -Doppelmarkierung) werden in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Fa. Philips) mit Quenchkorrektur durchgeführt. Die Szintillatorflüssigkeit besteht aus: 6 g Butyl-PBD, 600 ml Toluol und 400 ml Methylglykol.

2.3.3. Berechnung des Wasser- und Sorbit-permeablen Raumes:

Die Bestimmung des Sorbit- und Wasser-Raums basiert auf der Messung des Anteils des radioaktiven Überstandes (in µl), der sich nach der Zentrifugation im Sediment befindet.

Gesuchter Raum

$$= \frac{\text{dpm in Sediment} \cdot \text{Volumen Überstand}}{\text{dpm in Überstand} \cdot \text{mg Chlorophyll/Probe}}$$

Folgende Regelwerte wurden gemessen:

^3HHO 30 - 96 µl/mg Chl

^{14}C -Sorbit 18 - 58 µl/mg Chl

Impermeabler Raum 11 - 34 µl/mg Chl

2.4. Methodik der vier Experimenttypen:

Die Messung des Dicarbonsäuretransportes erfolgte in vier verschiedenen experimentellen Anordnungen:

A) Es wurde die Aufnahme von radioaktiv markierten Dicarboxylaten in unbehandelte Chloroplasten gemessen. Auf diese Weise wurden die kinetischen Konstanten des Dicarboxylatcarriers ermittelt.

B) In Abwandlung von Experiment A wurden die Chloroplasten vorher mit bestimmten unmarkierten Dicarboxylaten beladen und erst dann die Aufnahme von radioaktiv markierten Dicarboxylaten gemessen.

C) In Abwandlung von Experiment B wurden die Chloroplasten vorher mit ^3H -markierten Dicarboxylaten beladen und dann die Aufnahme von ^{14}C -markierten Dicarboxylaten gleichzeitig mit der Freisetzung von ^3H -markierten Dicarboxylaten verfolgt. Mit dieser Versuchsanordnung konnte die Bilanz des Ein- und Austransportes ermittelt werden.

D) Wie in C wurden die Chloroplasten zunächst mit radioaktiv markierten Dicarboxylaten beladen und der Austritt der Markierung nach Zugabe unmarkierter Dicarboxylate gemessen.

2.4.1. Experimenttyp A:

2.4.1.1. Durchführung

Bei den Experimenten des Typs A wurden die Chloroplasten nach der Präparation im Medium suspendiert, das tritiiertes Wasser mit einer spezifischen Aktivität von 10^{-4}Ci/Mol enthielt. Zur Chlorophyllbestimmung wurden 300 μl homogener Suspension entnommen. Nach Beschickung der wie oben vorbereiteten Polyäthylentröhrchen mit je 300 μl

Chloroplastensuspension wurden diese im Wasserbad einer Kühlinse bei Dämmerlicht auf 4°C gehalten.

Bei der Erstellung der Aufnahmekinetiken wurde zu den 300 μl Suspension mittels kleiner Metallhäkchen 10-20 μl radioaktiv-markierter Dicarbonsäurelösung zugegeben (spez. Aktivität bei ^{14}C -Isotopen 1000 - 4000 dpm/Mol). Zur gewünschten Zeit wurde jede Probe für sich zentrifugiert.

Bei den Konzentrationsabhängigkeiten wurde der Transportvorgang bereits 11 - 15 sec nach Substratzugabe durch Zentrifugation gestoppt.

Bei Ermittlung von K_m und $V_{\max}$ für nur eine Substanz, z.B. für Malat, wurde zu 6 Röhrchen Chloroplastensuspension die Äpfelsäure in steigender Konzentration zugegeben.

Sollte gleichzeitig die K_i einer Dicarbonsäure gemessen werden, z.B. von Fumarat, wurden zu 12 Röhrchen Chloroplastensuspension jeweils die 6 verschiedenen Malatkonzentrationen in je 10 μl Lösungsmittel gegeben. Außerdem wurden gleichzeitig zu 6 Röhrchen je 10 μl Wasser und zu den übrigen 6 Röhrchen je 10 μl Fumarat in gleicher Konzentration (Endkonzentration 1mM) beigemischt. Die vergleichende Bestimmung von K_m und K_i wurde grundsätzlich in einem Mischvorgang durchgeführt.

Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei der Raumbestimmung.

2.4.1.2. Berechnung

Die Dicarbonsäuren wurden im Überschuß zugegeben. Trotz der Aufnahme von markiertem Substrat in das Sediment (etwa 1%) und der eventuellen Abgabe von nicht markierten Dicarboxylaten ins Medium blieben die anfängliche Substratkonzentration und die spezifische Aktivität auch bei längsten Reaktionszeiten praktisch unverändert.

Für die Berechnung der aufgenommenen Substratmengen wurden die zugehörigen HHO- und Sorbitraumwerte eingesetzt.

Wie bei der Berechnung der Räume wurde durch den Vergleich der Gesamtaktivität in Überstand und Sediment ein jetzt allerdings fiktiver Substratraum errechnet. Dieser wich vom HHO-Raum ab, und zwar um den Faktor, um den die Substratkonzentration im HHO-Raum die Substratkonzentration im Medium überstieg.

Nach Umrechnung auf den Substratraum pro mg Chlorophyll wurde der ^{14}C -Sorbit-Raum/mgChl abgezogen. Das bleibende Raumvolumen wurde mit der Substratendkonzentration multipliziert und ergab so die Substratmenge im Sorbit-impermeablen Raum.

Aufgenommene Substratmenge/mg Chl =

$$\left(\frac{\text{dpm Sediment} \cdot \mu\text{l Überstand}}{\text{dpm Überstand} \cdot \text{mg Chl}_{\text{Probe}}} - {}^{14}\text{C-Sorbit-Raum/mg Chl} \right) \cdot \text{Substratkonzentration}$$

Substratkonzentration = Endkonzentration der markierten Dicarbonsäure im Medium.

Division dieses Wertes durch den Sorbit-impermeablen Raum ergab die Substratkonzentration im Sorbit-impermeablen Raum.

2.4.2. Experimenttyp B:

Wie in B wurden die Chloroplasten mit einer allerdings nicht markierten Dicarbonsäure inkubiert; dann wurde markierte Dicarbonsäure zum Austausch zugegeben.

2.4.3. Experimenttyp C:

Zur Messung des gegenseitigen Austauschtransportes wurden Chloroplasten in einer z.B. ^3H -markierten Dicarbonsäurelösung inkubiert, so daß der natürlicherweise vorhandene Bestand an Dicarbonsäuren gegen das neue Substrat ausgetauscht wurde. Dann wurde eine ^{14}C -markierte Dicarbonsäure zugegeben und der Austausch bestimmt.

2.4.3.1. Besondere Vorbemerkungen:

Die ^3H -markierten Substanzen wurden prinzipiell vor Verwendung gefriergetrocknet, um eine Vortäuschung zu hoher Radioaktivität durch ^3HHO auszuschalten.

Die Meßtechnik erforderte besondere Überlegungen bezüglich des Quantums an einzusetzender Radioaktivität:

Aus meßtechnischen Gründen mußte nämlich bei ^{14}C - ^3H -Doppelmarkierung das Verhältnis Aktivität ^3H : Aktivität ^{14}C etwa 10:1 betragen, um nicht korrigierbare Überstrahlungen vom ^{14}C -Kanal in den ^3H -Kanal zu vermeiden.

Bei Vorbeladung der Chloroplasten mit ^3H -Dicarbonsäure mußte also soviel Aktivität eingesetzt werden, daß die später ins Medium freigesetzte ^3H -Aktivität die hohe ^{14}C -Aktivität im Überstand um etwa das 10-fache übertraf.

Andererseits sollte auch im Sediment während des ganzen Experiments noch 10mal mehr ^3H - als ^{14}C -Aktivität vorhanden sein - auch bei langen Austauschzeiten. Unter diesen Voraussetzungen betrug die ^3H -Aktivität bei kurzen Gegentauschzeiten weit mehr als das 10-fache des entsprechenden ^{14}C -Radioaktivitätswertes. In diesen Fällen wurde die ^{14}C -Aktivität wegen Überstrahlung vom ^3H - in den ^{14}C -Kanal zu hoch angegeben. Da diese Überstrahlung jedoch prozentual konstant war, konnte dieser experimentelle Fehler korrigiert werden.

2.4.3.2. Durchführung

Nach der Präparation wurden 500-1000 μ l der konzentrierten Chloroplastensuspension bei 0°C und Dunkelheit für 15-20 min mit 0,05-0,1 ml Dicarbonsäurelösung (Enkonzentration 6-12 mM) inkubiert. Die spezifische Aktivität der verwendeten Dicarbonsäurelösungen lag bei 2000-5000 dpm/nMol.

Nach der Inkubation wurden 30 ml Medium zugegeben und zur Bestimmung der spezifischen Aktivität 50 μ l entnommen. Dann wurde bei 750 x G zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und noch zweimal auf diese Weise durch Verdünnung das Substrat im Medium praktisch vollständig entfernt. Jetzt wurde mit Medium eine homogene Suspension vom benötigten Volumen hergestellt und dann wie beim Experimenttyp A verfahren.

Bei Eröffnung jedes Austauschtransportes durch Zugabe von 10 μ l 14 C-Dicarboxylat (1000-4000 dpm/nMol; Konzentration 0,1-1 mM) oder 3 H-Dicarboxylat (60000-140000 dpm/nMol; 0,1-1 mM) wurden zwei Röhrchen mit je 300 μ l vorbeladener Chloroplastensuspension zentrifugiert. Daraus wurde bestimmt, wieviel nMole der vorbeladenen Dicarbonsäure bis zu diesem Zeitpunkt ins Medium freigesetzt worden bzw. im Sorbit-impermeablen Raum verblieben waren = Kontrollwert-Überstand bzw. -Sediment.

Dieser Kontrollwert (Leakage) erfaßt den Austritt von Dicarboxylaten ohne gleichzeitige Aufnahme eines anderen Dicarboxylats.

2.4.3.3. Berechnung

Freigesetzte nMole/mgChl :

$$\text{Kontrollwert Überstand} = \frac{\text{dpm Überstand}}{\text{spez. Aktivität} \cdot \text{mgChl}_{\text{Probe}}}$$

Noch im Sorbit-impermeablen Raum vorhandene nMole/mgChl

$$\text{Kontrollwert Sediment} = \frac{\text{dpm Sediment}}{\text{spez. Aktivität} \cdot \text{mgChl}_{\text{Probe}}}$$

Gegentauschbilanz

Die nMole/mg Chl an aufgenommener Dicarbonsäure berechnen sich wie bei Experimenttyp A.

Die nMole/mg Chl an freigesetzter Dicarbonsäure lassen sich sowohl aus der Zunahme der Radioaktivität im Überstand, wie auch aus deren Abnahme im Sediment bestimmen.

Hier Berechnung aus dem Überstand:

Freigesetzte nMole/mgChl = Freigesetztes Substrat im Überstand und freigesetztes Substrat im Sorbit-Raum abzüglich des (Leakage)Kontrollwertes-Überstand.

$$N = \frac{\text{dpm Überstand}}{\text{spez.Akt.} \cdot \text{mgChl}_{\text{Probe}}} +$$

$$\frac{\text{dpm } \bar{U}b - \text{dpm } \bar{U}b_{\text{Kontrolle}}}{\text{spez.Akt.} \cdot \text{Volumen}_{\bar{U}b}} \cdot \text{Sorbit-Raum/mgChl} -$$

$$\frac{\text{dpm } \bar{U}b_{\text{Kontrolle}}}{\text{spez.Akt} \cdot \text{mgChl/Probe}}$$

2.4.4. Experimenttyp D:

Zur Untersuchung des Austritts von Dicarboxylaten ohne gleichzeitige Aufnahme = Leakage in Abhängigkeit von Temperatur, Belichtung und anderem wurden die Chloroplasten wie in 2.4.3. mit markierter Dicarbonsäure bzw. $^{32}\text{P-H}_3\text{PO}_4$ (6mM, 4000 dpm/nMol) inkubiert und dann die Freisetzung ohne gleichzeitige Aufnahme gemessen.

Die Werte bei 20°C wurden in einem Wasserbad, welches auf Zimmertemperatur eingestellt war, ermittelt. Die Belichtung wurde drei Minuten vor der Messung begonnen und auch während der Zentrifugation aufrechterhalten. Hierzu wurden Wolfram-Halogen-Lampen (Beleuchtungsstärke 80ker/cm².sec) verwendet.

2.5. Messung der Temperaturabhängigkeit:

Bei einer Substratkonzentration von 0,06 mM wurde die Aufnahmesteigerung von ^{14}C -markierter Dicarbonsäure bei von 0° - 19°C variierten Temperaturen bestimmt. Meßzeit 5-10 Sekunden.

Berechnung der Aktivierungsenergie:

$$\log K = \text{Konstante} - \frac{A}{2,3 \cdot R} \cdot \frac{1}{T}$$

$T = ^{\circ}\text{Kelvin}$

$R = 0,002 \frac{\text{kcal}}{\text{Mol}}$

Nach dieser allgemeinen Gleichung wird der Logarithmus der Aufnahmegeschwindigkeit in Richtung y-Achse und die Meßtemperatur jeder Probe als $\frac{1}{T}$ in Richtung x-Achse aufgetragen. Aus der Steigung der dabei entstehenden Geraden errechnet sich A .

2.6. Dünnschichtradiographie:

Um das Schicksal der aufgenommenen Dicarboxylate zu verfolgen, wurden mit radioaktiv-markierten Dicarboxylaten beladene Chloroplasten gewaschen und in HClO_4 denaturiert; dann wurden sie mit KOH neutralisiert und zentrifugiert.

Der klare Überstand wurde auf Zellulose-Dünnschichtplatten (20 x 20 cm, DC Fertigplatten, Merck Darmstadt) aufgetragen. Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus Äthanol, Ammoniak und Wasser (Verhältnis 8 : 2 : 1) verwendet; Laufzeit 1/2 bis 3 Stunden. Für die Auswertung wurde ein TLC-Scanner (Berthold-Friessecke, Karlsruhe) verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Kinetik des Dicarbonsäuretransportes

Als Beispiel der Zeitabhängigkeit des Transportes von radioaktiv markiertem Aspartat wird Abb. 3 gezeigt.

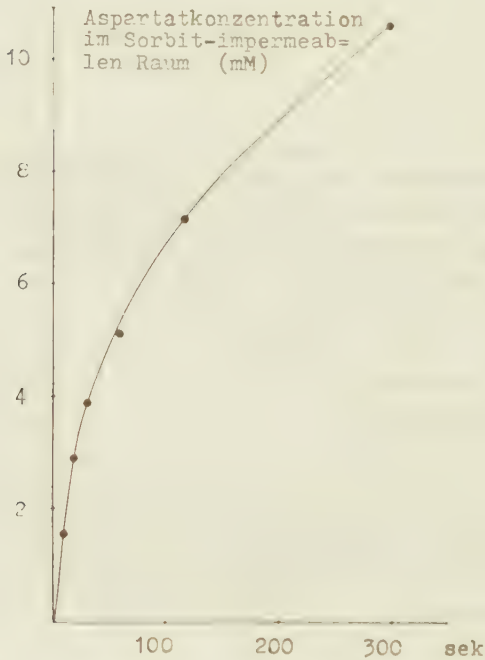


Abbildung 3

Kinetik der Aspartataufnahme in den Sorbit-impermeablen Raum von Chloroplasten. (Aspartatkonzentration im Medium 0,4 mM) Temp. 4°C.

Dieser Transport führte zu einer Substratanhäufung in den Chloroplasten. Nach 300 Sekunden war die Konzentration von markiertem Aspartat im Chloroplasten etwa 20-fach höher als im Medium. Mittels Dünnschichtradiographie wurde nachgewiesen, daß das aufgenommene Aspartat keiner bedeutenden metabolischen Umwandlung unterliegt.

Der Dicarboxylattransport lief sehr schnell ab. Um die Transportraten mit genügender Genauigkeit zu messen, mußten die Bestimmungen daher bei niedrigen Temperaturen und innerhalb kurzer Zeit durchgeführt werden. Die im Folgenden angeführten Daten sind deshalb durch Transportmessungen über 10-15 Sekunden und bei 4°C gewonnen worden.

Wie die Abbildung 3 zeigt, kann man aus dem ersten Meßpunkt (10 sec) mit hinreichender Genauigkeit die für diese Konzentration maximale Transportrate berechnen.

Die Tabelle 1 zeigt das Ergebnis einer Transportratenbestimmung.

Tabelle 1

Dicarbonsäureaufnahme (0,45 mM) in den Sorbit-impermeablen Raum. Temp. 4°C

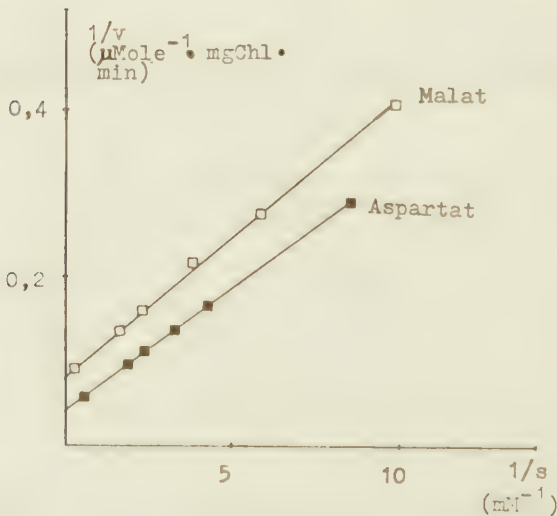
	$\mu\text{Mol/mg Chl} \cdot \text{h}$
L-Aspartat	15,0
L-Malat	12,0
Malonat	0,05
Citrat	0,05

Während Aspartat und Malat in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen (Heldt und Sauer 1971) sehr schnell transportiert wurden, waren die Aufnahmeraten für die Dicarbon-

säure Malonsäure und die Tricarbonsäure Citrat extrem niedrig. Die strenge Selektion bei der Aufnahme dieser Substrate zeigt deutlich die Spezifität des Dicarboxylattransportes.

3.2. Enzymatische Konstanten K_m und V_{max}

Im Experiment der Abbildungen 4 A und B wurde durch Variieren der Substratkonzentration im Medium die Konzentrationsabhängigkeit des Dicarbonsäuretransportes untersucht.



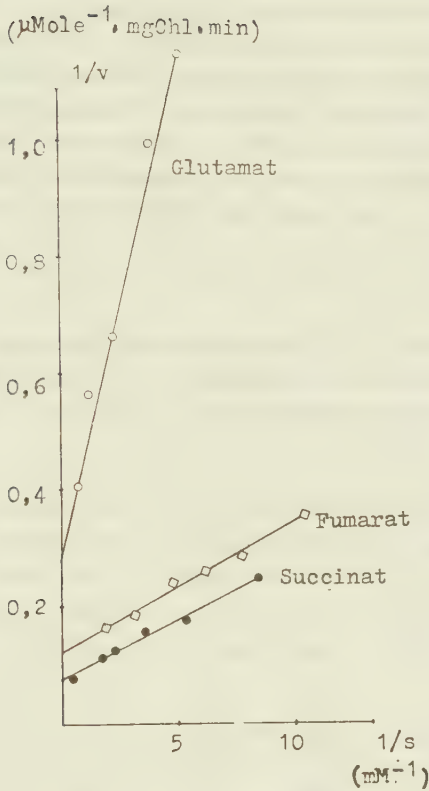


Abbildung 4 A und B

Konzentrationsabhängigkeit der Dicarboxylataufnahme
 4°C , 10 sec

Es zeigte sich, daß die Substratkonzentration im Sorbit-impermeablen Raum mit steigender Dicarboxylatkonzentration im Medium einen Maximalwert erreichten; offenbar zeigt

der Transport ein Sättigungsverhalten.

Die doppelt reziproke Auftragung der Substratkonzentration im Medium gegen die entsprechende Konzentration im Sorbit-impermeablen Raum (Abb. 4 A und B) ergab eine lineare Funktion, welche die Bestimmung von K_m (= jene Substratkonzentration, bei der man halbmaximale Transportraten findet) und V_{max} (= maximale Transportgeschwindigkeit) ermöglichte. Die Tabelle 2 zeigt repräsentative Mittelwerte für K_m und V_{max} aus mehreren Experimenten.

Tabelle 2

Kinetische Konstanten des Dicarbonsäuretransportes
4°C 10 sec; n = Anzahl der Messungen, σ = Standardabweichung, V_{max} in $\mu\text{Mol/mg Chl} \cdot \text{h}$

	V_{max}	σ	K_m	σ	n
L-Malat	18,6	7,0	0,39	0,06	11
Succinat	14,0	4,4	0,26	0,04	9
Fumarat	18,6	3,5	0,21	0,04	5
L-Aspartat	31,1	16,1	0,72	0,14	11
L-Glutamat	7,9	3,2	1,17	0,23	5

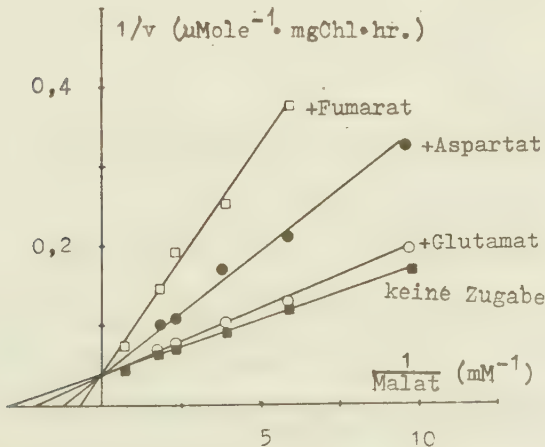
Man sieht aus diesen Daten, daß der Dicarboxylatcarrier eine hohe Affinität zu Fumarat und Succinat, gefolgt von Malat besitzt; eine weitaus niedrigere Affinität besteht für Aspartat und Glutamat. Dagegen ist die maximale Transportgeschwindigkeit bei Aspartat am größten.

Die für eine Dicarbonsäure ermittelten K_m -Werte zeigten geringe Variation. Im Gegensatz dazu wiesen die Absolut-

werte für die $V_{\max}$ beachtenswerte Schwankungen zwischen verschiedenen Chloroplastenpräparationen auf. Die Werte der Tabelle 2 wurden mit Blattmaterial vom Gemüsemarkt oder aus eigenen Beständen gewonnen. Diese Chloroplasten zeigten gewöhnlich eine CO_2 -Fixierungsrate von 40-60 $\mu\text{Mol/mgChl} \cdot \text{h}$ (Werdan et al. 1975). Bei Verwendung von Spinat, der in Wasserkulturen nach Lilley and Walker (1974) gezogen wurde und CO_2 -Fixationsraten von etwa 100 $\mu\text{Mol/mgChl} \cdot \text{h}$ erbrachte, lagen die $V_{\max}$ -Werte teilweise bis zu 5mal höher als in Tabelle 2, während die K_m -Werte nicht wesentlich geändert waren.

3.3. Konkurrenz der Dicarbonsäuren

Die Dicarbonsäuren verhielten sich bezüglich der Aufnahme in die Chloroplasten gegeneinander kompetitiv.



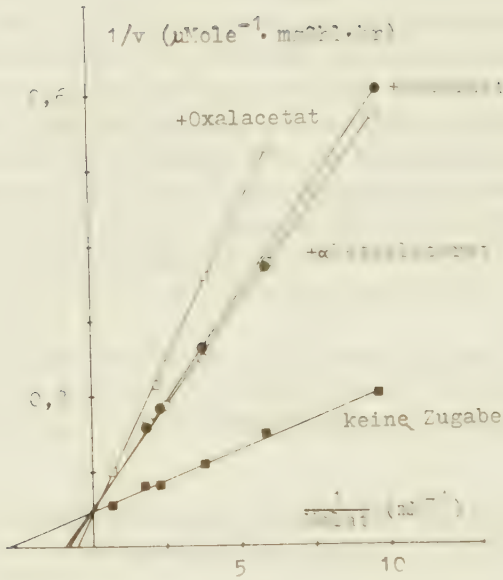


Abbildung 5 A und B

Transport von Malat; Hemmung durch 1mM Dicarbonsäuren. 4°C

In Abbildung 5 A und B wird gezeigt, daß die Aufnahme von Malat durch Zugabe von Fumarat, Aspartat, Glutamat, Succinat, Oxalacetat und α -Ketoglutarat kompetitiv gehemmt wurde.

Abbildung 6 A und B zeigen gegenseitige Konkurrenz für den Transport von Malat und Fumarat.

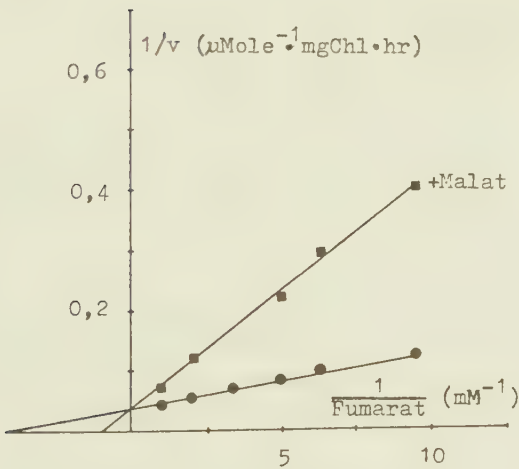
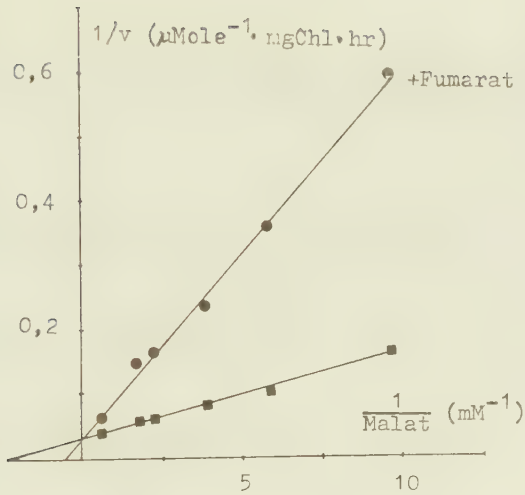


Abbildung 6 A und B

Konzentrationsabhängigkeit des Malattransportes;

Hemmung durch Fumarat 1 mM

Konzentrationsabhängigkeit des Fumarattransportes;

Hemmung durch Malat 1 mM

In Tabelle 3 ist die Auswertung dieses und zweier ähnlicher Experimente wiedergegeben.

Tabelle 3

Vergleich von K_m und K_i transportierter Dicarbonsäuren

Experiment Nr.	Transport von	K_m (mM)	Hemmung durch	K_i (mM)
38	L-Malat	0,42	Fumarat	0,31
	Fumarat	0,27	L-Malat	0,37
	Succinat	0,29	Fumarat	0,30
	Fumarat	0,29	Succinat	0,30
37	L-Malat	0,43	Succinat	0,35
	Succinat	0,30	L-Malat	0,50
43	L-Malat	0,39	L-Aspartat	0,52
	L-Aspartat	0,72	L-Malat	0,72

Innerhalb der experimentellen Schwankungsbreite war die K_m von Malat sehr ähnlich der K_i von Malat bei Hemmung des Fumarat- und Succinattransportes. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch für die K_m und K_i von Fumarat und Succinat.

Diese Resultate sind eine klare Aussage darüber, daß Malat, Succinat und Fumarat am gleichen Carrier gebunden werden.

Für Aspartat war die Situation nicht ganz so klar. Die K_i für Aspartat bei Hemmung von Malat, Fumarat und Succinat war nämlich niedriger als die K_m für den Aspartattransport. Hingegen war die K_i für Malat, Fumarat

und Succinat bei Hemmung des Aspartattransportes größer als die K_m für den Transport dieser Dicarbonsäuren. Glutamat verhielt sich in dieser Beziehung ähnlich wie Aspartat.

Diese Untersuchungen wurden mit vorher unbehandelten Chloroplasten durchgeführt, die ihre ursprüngliche Ausstattung von Dicarboxylaten im Sorbit-impermeablen Raum besaßen. Tabelle 4 zeigt die Analyse der in isolierten Chloroplasten enthaltenen Dicarboxylate.

Tabelle 4

Dicarbonsäuregehalt von frisch nach der Isolation präparierten Chloroplasten in nMol/mgChl

Experiment:	A	B	C
L-Malat	129	148	104
α -Ketoglutarat	3,8	6,5	4,3
L-Aspartat	245	273	235
L-Glutamat	491	532	366

Es wurden vor allem Aspartat und Glutamat neben geringeren Mengen von Malat gefunden.

Im Experiment der Tabelle 5 wurden K_m und K_i von Malat und Aspartat gemessen, nachdem die Chloroplasten zuvor mit Aspartat oder Malat beladen worden waren.

Tabelle 5

K_m und K_i für Malat und Aspartat bei Vorbeladung der Chloroplasten mit kaltem Malat und Aspartat

Vorbeladung mit	Transport von	K_m	Hemmung durch	K_i
L-Aspartat	L-Malat	0,22	L-Aspartat	0,21
	L-Aspartat	0,49	L-Malat	1,69
L-Malat	L-Malat	0,54	L-Aspartat	0,87
	L-Aspartat	0,76	L-Malat	0,56

Bei Aspartatbeladung waren, wie die Tabelle 5 zeigt, die K_m - K_i -Unterschiede stark ausgeprägt. Die Hemmkonstante K_i lag für Malat 7fach höher als die Michaeliskonstante. Die Hemmkonstante für Aspartat war dagegen nicht einmal halb so groß wie die K_m .

Hingegen stimmten nach Vorbeladung der Chloroplasten mit Malat die jeweiligen K_m -und K_i -Werte sowohl für Malat als auch für Aspartat relativ gut überein.

Die Abweichungen der jeweils zwei K_m -Werte voneinander sind meßtechnisch bedingt, da der K_m -Wert von der Beladungsart unabhängig ist.

Die angeführten Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß Abweichungen des K_i -Wertes vom K_m -Wert von der Art der Vorbeladung abhängig sind. Die Aufklärung der ursächlichen Beziehungen zwischen K_m , K_i , V_{max} und Vorbeladung bedarf jedoch noch weiterer Studien.

3.4. Spezifität des Dicarbonsäurecarriers

Trotz dieses abweichenden Verhaltens von Aspartat gibt die Bestimmung der K_i brauchbare Informationen über die Spezifität des Dicarbonsäurecarriers.

In den Experimenten der Tabellen 6, 7 und 8 wurde die Hemmwirkung verschiedener Dicarbonsäuren auf den Malat- und Aspartattransport gemessen.

Tabelle 6

Kompetitive Hemmung des Malattransportes (K_m 0,34) in den Sorbit-impermeablen Raum von Spinatchloroplasten

Hemmer	K_i (mM)
Succinat	0,35
Fumarat	0,32
Oxalacetat	0,26
L-Aspartat	0,58
Meso-Tartrat	0,83
L-Tartrat	1,08
D-Tartrat	2,71
Thiomalat	0,91
α -Ketoglutarat	0,40
L-Glutamat	1,00
Glutarat	1,97

Tabelle 7

Kompetitive Hemmung des Succinattransportes (K_m 0,25 mM) in den Sorbit-impermeablen Raum von Spinatchloroplasten

Hemmer	K_i (mM)
L-Malat	0,19
D-Malat	0,17

Aus der Tabelle 8 läßt sich die Wirkung solcher schwacher Inhibitoren auf den Transport von Malat ablesen.

Tabelle 8

Hemmung des Malattransporter (0,53 mM) in den Sorbit-impermeablen Raum von Spinatchloroplasten

Hemmer (1mM)	% Hemmung des Malattransportes
Malonat	0
Maleat	4
Orthophtalat	10
Fumarat	63
Succinat	58
Phenylsuccinat	0
Isophtalat	20
Glutarat	12
Adipinat	0
Terephtalat	6
Acetat	1
Phosphat	0
Citrat	0

Von diesen Daten können notwendige Strukturmerkmale für die Bindung von Substraten an den Dicarbonsärecarrier abgeleitet werden.

Voraussetzung scheint zu sein, daß die C-Atome einen bestimmten Abstand zueinander besitzen. Wenn dieser Abstand verkürzt wird, wie zum Beispiel bei der C 3-Substanz Malonat, beim C 4-cis-Isomer Maleat oder beim Orthophtalat, so besteht nur geringe oder keine Affinität zum Carrier.

Das Gleiche tritt ein, wenn die Distanz zwischen den 2 C-Atomen zu groß ist, wie bei der Adipinsäure.

Dagegen wird die Bindung der C 4-Dicarbonsäuren an den Carrier durch die Gegenwart einer OH- oder O-Gruppe am C 2 nur unwesentlich beeinflußt; außerdem besteht zum Beispiel auch kein Unterschied zwischen den Stereoisomeren D- und L-Malat.

Das Vorhandensein einer Aminogruppe am C 2 (Aspartat) führt nur zu einer leichten Verminderung der Affinität. Sie wird jedoch vollständig aufgehoben, wenn sich am C 2 eine Phenylgruppe befindet (Phenylsuccinat).

Weitere Substitution an der Position C 3, wie in Thiomalat oder Tartrat, mindert wiederum die Bindung an den Carrier.

Für die Affinität der C 5-Dicarbonsäuren scheint es von Bedeutung, daß der Wasserstoff in C 2 substituiert wird. Ersatz durch Sauerstoff (Ketoglutarat) bewirkt eine festere Bindung als Substitution durch eine Aminogruppe (Glutamat).

Es besteht auch ein mäßiges Bindungsvermögen des Transportsystems für Isophtalat, dagegen überhaupt keine Affinität zu Citrat, Acetat und Phosphat.

Die strukturellen Bedingungen des Dicarbonsärecarriers in Chloroplasten scheinen sich von den Eigenschaften des Dicarboxylat- und Ketoglutaratcarrier in Mitochondrien wesentlich zu unterscheiden (Palmieri et al. 1971).

Malonat und Maleat, die keine Affinität zum Chloroplastencarrier zeigten, werden durch das mitochondriale System gut transportiert.

Andererseits hat Fumarat, welches vom Chloroplastentransportsystem recht gut transportiert wurde, keine Affinität zum mitochondrialen System.

Aufgrund der dargelegten Eigenschaften des Chloroplasten-Dicarbonsäurecarriers ist es verständlich, daß die bekannten Hemmer des mitochondrialen Dicarbonsäuretransportes (Quagliariello et al. 1972), Butylmalonat und Phenylsuccinat, keinerlei hemmende Wirkung auf den Dicarbonsäuretransport in Chloroplasten ausüben. Auch mit 80 μ M Bathophenanthrolin, von dem kürzlich eine Hemmung des mitochondrialen Malattransportes berichtet worden war (Quagliariello et al. 1972), konnte keine Hemmwirkung beobachtet werden.

3.5. Gegentausch

Der Dicarbonsäuretransport in Chloroplasten verläuft im Gegentausch. In den Experimenten der Abbildungen 8 und 9, sowie der Tabellen 9 und 10 wurde die Bilanz dieses gegenseitigen Austausches geprüft.

Im Experiment der Abbildung 8 wurden die Chloroplasten mit ^{14}C -Malat im Dunkeln inkubiert. Mittels Dünnschicht-radiographie wurde nachgewiesen, daß während dieser Zeit keine metabolische Umwandlung der zur Vorbeladung verwendeten Dicarbonsäure erfolgte.

Darauf wurde ^3H -Aspartat zugefügt und die Aufnahme bzw. Freisetzung beider Dicarbonsäuren im Doppelmarkierungs-verfahren gemessen.

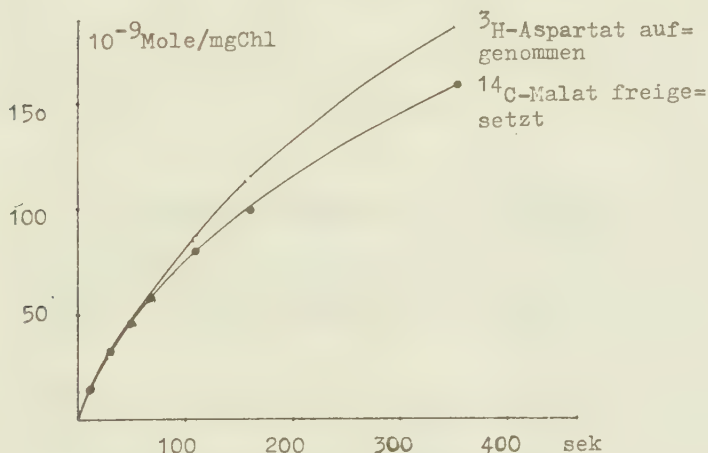


Abbildung 8
Gegentausch ^{14}C -Malat vorbeladen ^3H -Aspartat (0,2 mM)
im Medium zugegeben

Im Experiment der Abbildung 9 wurden die Chloroplasten mit ^3H -Aspartat inkubiert und dann ^{14}C -Malat zugegeben.

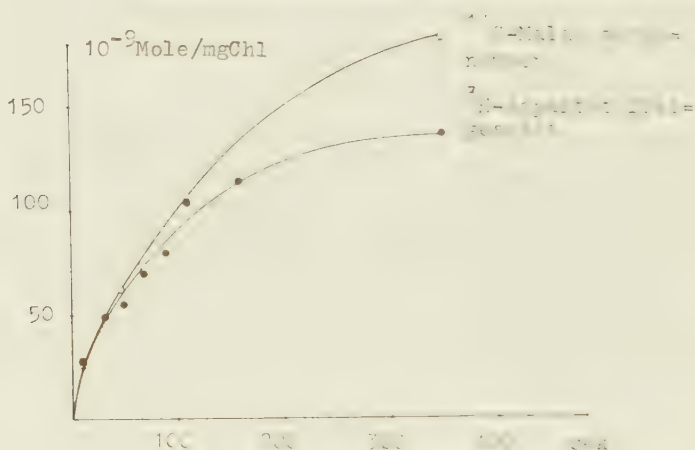


Abbildung 9

Gegentausch ^{14}C -Malat (1,0 mM) im Medium zugegeben

Bei beiden Experimenten war in der Anfangsphase des Austausches die Aufnahme rate für Dicarbonsäuren gleich groß wie die Freisetzungsr ate.

Sehr ähnliche Ergebnisse zeigten die Experimente der Tabellen 9 und 10.

Hier wurden die Chloroplasten mit ^3H -Succinat bzw. ^3H -Aspartat vorbeladen und dann verschiedene ^{14}C -markierte Dicarbonsäuren zugegeben. Die Reaktion wurde nach 30 Sekunden beendet und dann die Gegentauschbilanz bestimmt.

Tabelle 9

Gegentauch der Dicarbonsäuren: ^3H -Succinat vorbeladen;
Aufnahme und Freisetzung in $\mu\text{Mole/mgChl} \cdot 30 \text{ sec}$; 4°C

^{14}C -Dicarbonsäure zugegeben	Aufnahme	^3H -Succinat freigesetzt
L-Malat	102	94
Fumarat	116	96
Succinat	116	100
α -Ketoglutarat	75	72
L-Aspartat	79	60
L-Glutamat	21	14

Tabelle 10

Gegentauch der Dicarbonsäuren ^3H -Aspartat beladen
Aufnahme und Freisetzung in $\mu\text{Mole/mgChl} \cdot 30 \text{ sec}$; 4°C

^{14}C -Dicarbonsäure zugegeben	Aufnahme	^3H -Aspartat freigesetzt
L-Malat	81	74
Fumarat	71	64
Succinat	71	72
α -Ketoglutarat	70	67
L-Aspartat	117	116
L-Glutamat	41	35

In allen Fällen waren die Beträge des freigesetzten Succinat und Aspartat gleich oder nur wenig niedriger als der Betrag der jeweils aufgenommenen Dicarbonsäure.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß der Transport aller getesteten Dicarbonsäuren im Gegentausch vor sich geht. Dabei scheinen alle Kombinationen der Dicarbonsäuren zum Gegentausch möglich zu sein.

In den späteren Phasen des zeitlichen Ablaufs in Abbildung 8 und 9 wurden mehr markierte Dicarbonsäuren aufgenommen als freigesetzt. Diese zusätzliche Aufnahme könnte natürlich in Zusammenhang mit unmerkter Freisetzung nicht markierter Dicarbonsäuren stehen. Hier käme als Substrat zum Beispiel Glutamat in Frage, welches in großer Menge in unbehandelten Chloroplasten gefunden (Tabelle ~) und viel langsamer als die übrigen Dicarbonsäuren transportiert wird. Andererseits könnte es auch sein, daß der Gegentausch nicht so streng gekoppelt ist und ein Nettotransport in eine Richtung erfolgt. Die Rate dieses gerichteten Transports wäre um mehr als eine Größenordnung niedriger als die Rate beim normalen Gegentauschtransport. Dieser Transport vom Medium in das Chloroplastenstroma wäre gegen den Konzentrationsgradienten gerichtet, da in den Experimenten die Dicarbonsäurekonzentrationen im Sorbit-impermeablen Raum immer viel höher als im Medium waren.

Es zeigte sich, daß die Summe der zusätzlichen Dicarbonsäureaufnahme ohne gleichzeitige Freisetzung - siehe Abbildung 8 und 9 Spätzeitwerte - durch die Belichtung der Chloroplastensuspension etwas vermindert wird. In einem Experiment mit Chloroplasten, die mit Succinat vorbeladen waren, war die Rate der Aspartataufnahme abzüglich der Succinatfreisetzung bei 18°C $0,8 \mu\text{Mole/mgChl} \cdot \text{h}$ bei Belichtung; im Dunkeln betrug sie jedoch $1 \mu\text{Mol/mgChl} \cdot \text{h}$.

Sollte bei dieser zusätzlichen Aspartataufnahme tatsächlich ein gerichteter Transport beteiligt sein, muß man sich fragen, mit welcher Energie dieser Transport aufrechterhalten wird.

Zur Beantwortung dieser Frage werden weitere Studien nötig sein.

3.6. Freisetzung der Dicarbonsäuren ohne Aufnahme = Leakage

Angesichts der Möglichkeit eines langsamen einwärts gerichteten Transports der Dicarbonsäuren, stellte sich die Frage, ob es auch zu einer einseitigen Dicarbonsäure-Freisetzung kommt. Ein einseitiger Auswärtstransport ohne gleichzeitige Aufnahme konnte tatsächlich beobachtet werden, wie in Tabelle 11 gezeigt wird.

Tabelle 11

Freisetzung von Dicarbonsäuren aus dem Sorbit-impermeablen Raum in Abwesenheit von Dicarbonsäuren im Medium.

Raten in $\mu\text{Mole/mgChl} \cdot \text{h}$

Freisetzung von	Temperatur	Dunkel Raten	Licht
L-Aspartat	0°	0,05	0,17
	20°	0,49	1,25
Fumarat	0°	0,11	0,20
	20°	0,27	0,82
Phosphat	0°	0,02	0,02
	20°	0,06	0,07

Die Freisetzungsraten lagen um etwa 2 Größenordnungen niedriger als beim normalen Gegentausch.

Bemerkenswert erscheint, daß diese einseitige Freisetzung bei den spezifischen Substraten des Phosphatcarriers, wie ^{32}P Phosphat, nicht festgestellt werden konnte. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, wonach beim Phosphatcarrier auch keine einseitige Substrataufnahme ohne Gegentausch beobachtet werden konnte (Heldt et al. 1974).

Offensichtlich ist der Gegentausch im Phosphattransportsystem stärker gekoppelt als der Dicarbonsäuretransport, so daß ein Verlust von Phosphat und phosphorylierten Substraten nach außen verhindert wird.

Interessanterweise nahm die einseitige Freisetzung von Dicarbonsäuren bei Belichtung zu. Dies paßt zur Hemmung des nach innen gerichteten, einseitigen Dicarboxylattransportes durch Belichtung.

Die Ursachen für dieses Phänomen müssen noch genauer erforscht werden.

3.7. Temperaturabhängigkeit

Aus der Steigung der beiden linearen Funktionen in Abbildung 10 wurde die Aktivierungsenergie für den Succinat- und Aspartattransport berechnet.

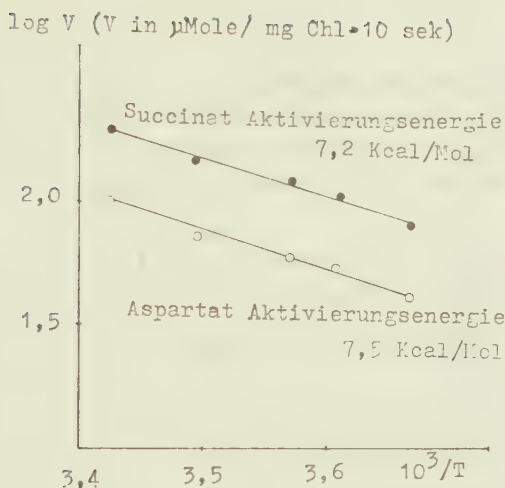


Abbildung 10

Temperaturabhängigkeit des Succinat- und Aspartat-transportes; eingesetzte Konzentration $60 \mu\text{M}$. $T = -273^\circ\text{C}$

Die Aktivierungsenergie lag viel niedriger als etwa beim Phosphatcarrier. Sie betrug für Succinat 7,2 und für Aspartat 7,5 Kcal/Mol und war somit wesentlich geringer als die Aktivierungsenergie des Phosphatcarriers (16 Kcal/Mol) (Fliege 1976).

Aus diesem Wert ergab sich durch Extrapolieren, daß die Transportrate bei 20° etwa gut zweimal so groß wie bei 4°C Meßtemperatur ist.

4. DISKUSSION

Nachdem einige wichtigere Eigenschaften des Dicarbonsäurecarriers dargestellt worden sind, möchte ich noch auf die mögliche Bedeutung dieses Transportsystems eingehen. Dazu muß auch die Funktion des Phosphatecarriers kurz angesprochen werden.

Dieser Carrier bewirkt den Austransport der bei der CO_2 -Fixierung gebildeten Triosephosphate im Gegentausch mit anorganischem Phosphat. Daneben katalysiert er auch einen Gegentausch zwischen Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und 3-Phosphoglycerat (PGA). Dabei wird PGA vom Cytosol in den Stromaraum aufgenommen, um dort zu DHAP mit Hilfe von ATP und NADPH reduziert zu werden. DHAP wird im Gegentausch freigesetzt und im Cytosol zu PGA oxidiert; dies vollzieht sich entweder in einer glykolytischen Teilreaktion unter Bildung von NADH und ATP oder in einer irreversiblen Reaktion unter Bildung von NADPH. Das Ergebnis dieses Gegentausches von PGA und DHAP ist ein indirekter Transport von ATP und Reduktionseinheiten über die Innenmembran von Stromaraum in das Cytosol.

Die Abbildung 11 gibt eine schematische Darstellung dieser Transportvorgänge.

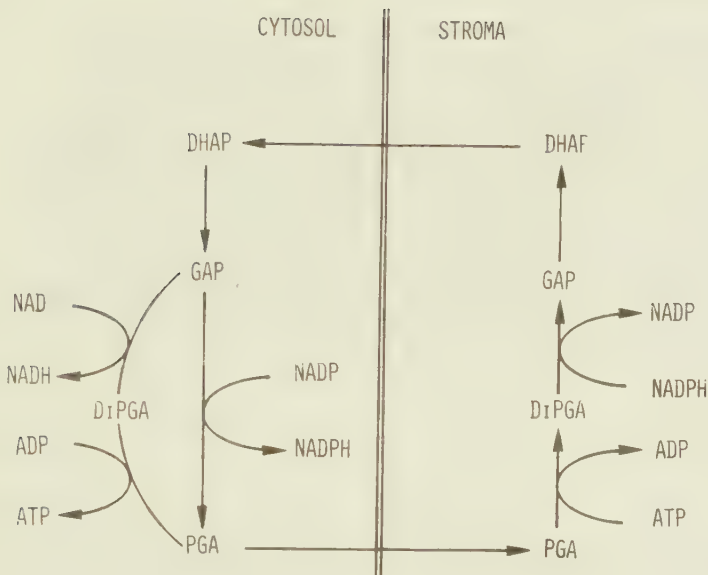


Abbildung 11

Schematische Darstellung der möglichen Beteiligung des Phosphatcarriers am Transport von Reduktionsäquivalenten

Bei der Oxidation von DHAP entstehen neben ATP auch NADH und NADPH. Letzteres wird direkt für biochemische Reaktionen verbraucht. Das gebildete NADH dagegen scheint nicht direkt für Biosyntheseleistungen verwendbar; es muß auf anderem Weg reoxidiert werden. Das Wie dieser Reoxidation ist weiterhin Gegenstand der Diskussion (Strotmann et al. 1976).

Eine Möglichkeit wäre die Oxidation durch die mitochondriale Elektronentransportkette (Palmer et al. 1974). Dies setzt allerdings eine beträchtliche Respirationsrate voraus. Die Atmung der Pflanzenzelle wird aber im Licht gehemmt. Damit ist die Reoxidation des überschüssigen NADH zumindest

bei Belichtung nicht möglich.

Dagegen könnten die Reduktionsäquivalente des NADH über den Dicarbonsäurecarrier indirekt in den Stromaraum rücktransportiert werden. Dort wäre eine Oxidation des NADH durch das NADPH des Stromas denkbar, da die Redoxpotentiale des Cytoplasma-NADH und des Stroma-NADH/NADPH möglicherweise nicht so unterschiedlich sind. Durch einen Kreislauf von Malat und Oxalacetat im Rahmen des Dicarbonsäuretransportsystems könnte ein indirekter Transport von Reduktionsäquivalenten vom Cytosol ins Stroma erfolgen (Abbildung 12 A) (Heber 1974, Strotmann et al. 1976).

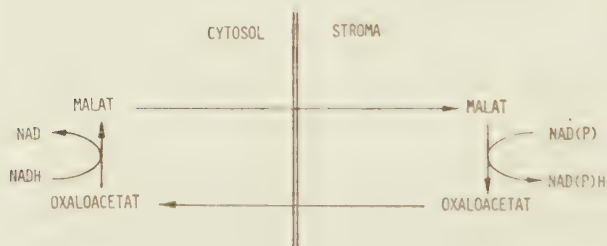


Abbildung 12 A

Das NADH des Cytosols wird durch Oxalacetat oxidiert und das hierbei gebildete Malat in das Stroma aufgenommen. Dort erfolgt Reduktion zu Oxalacetat. Da jedoch die Konzentration von Oxalacetat weiter unter der K_m für den Transport liegt, ist es fraglich, ob dieser Malat-Oxalacetat-Kreislauf einen nennenswerten Fluß an Reduktionsäquivalenten zustande bringt. Als Alternative könnte man einen Malat-Aspartat-Kreislauf annehmen (Abbildung 12 B).

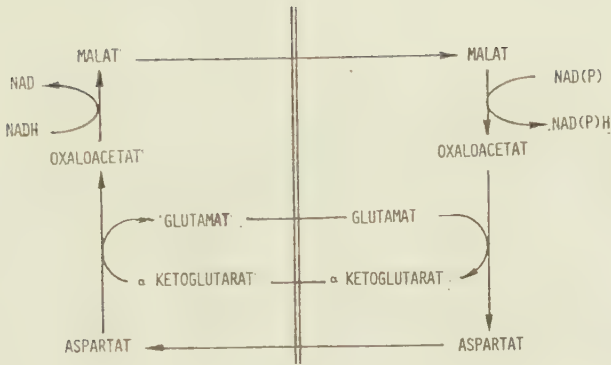


Abbildung 12 B

Schematische Darstellung der möglichen Beteiligung des Dicarbonsäurecarriers am Transport von Reduktionsäquivalenten

Die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, welche sowohl im Stroma als auch im Cytosol vorkommt (Santarius et al. 1969) bewirkt dabei die Transaminierung von Oxalacetat zu Aspartat und die Umbildung von Glutamat zu α -Ketoglutarat. Aspartat wird zusammen mit α -Ketoglutarat in das Cytosol freigesetzt; im Gegentausch werden Glutamat und Malat aufgenommen (Heber 1974). Der Effekt ist ein indirekter Transport von Reduktionsäquivalenten vom Cytosol in das Stroma.

Weitere Studien über die Verteilung der beteiligten Dicarbonsäuren in der Pflanzenzelle in vivo werden nötig sein, um die Bedeutung dieses Kreislaufs für den Pflanzenstoffwechsel abzuschätzen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der kürzlich von Heldt und Rapley (1970) beschriebene Dicarboxylatcarrier wird näher charakterisiert.

Im methodischen Teil werden die verwendeten Materialien, experimentelle Anordnungen und Berechnungen dargestellt.

Der Dicarboxylatcarrier transportiert Oxalacetat, Malat, Fumarat, Succinat, α -Ketoglutarat, Aspartat und Glutamat. Verschiedene ähnlich gebaute Dicarbonsäuren besitzen nur eine ganz minimale Affinität zum Dicarboxylatcarrier.

Die selektiv transportierten Dicarbonsäuren werden in den Chloroplasten angehäuft. Die enzymatischen Konstanten K_m , V_{max} und K_i werden bestimmt.

Die Dicarbonsäuren werden generell im 1 : 1 - Gegentausch aufgenommen. Unter bestimmten Versuchsbedingungen findet auch ein unidirektionaler Transport über die Innenmembran des Chloroplasten statt.

Der Dicarboxylattransport zeigt eine deutliche, wenn auch relativ geringe Abhängigkeit der Transportgeschwindigkeit von der Temperatur.

Die Bedeutung des Dicarboxylatcarriers im Rahmen des Pflanzenstoffwechsels wird diskutiert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Cockburn, W., Walker, D. und Baldry, C.W., (1968) Biochem. J. 107 (89)
2. Fliege, R., (1976) Dissertation in Vorbereitung, Medizinische Fakultät der Universität München
3. Heber, U., (1974) in Proceedings of the Third Intern. Congress on Photosynthesis (M. Avron ed.) 1335, Elsevier Scientific Publishing Comp. Amsterdam
4. Heber, U., (1974) Ann. Rev. Plant Physiol. 25 (393)
5. Heldt, H.W., (1969) FEBS Lett. 5 (11)
6. Heldt, H.W., Rapley, L., (1970) FEBS Lett. 10 (143)
7. Heldt, H.W., Sauer, F., (1971) Biochim. Biophys. Acta 234 (83)
8. Heldt, H.W., Werdan, K., Milovancev, M., Geller, G., (1973) Biochim. Biophys. Acta 314 (224)
9. Heldt, H.W., Fliege, R., Lehner, K., Milovancev, M., Werdan, K., (1974) in Proc. III. Int. Congr. of Photosynthesis Research, Rehovot, Israel; 1969, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands.
10. Klingenberg, M., Pfaff, E., (1967) Methods Enzymol., 10 (680)
11. Leech, R.M., (1966) in Godwin T.W., Biochemistry of Chloroplasts Vol. 1, London, New York, 65
12. Lilley, R. McC., Walker, D.A., (1974) Biochim. Biophys. Acta 368 (269)
13. Palmer, J.M., Colemann, J.O.D. (1974) in Horizons in Biochemistry (E. Quagliariello, F. Palmieri, T.P. Singer eds.) 220; Addison-Wesley Publishing Comp., Reading, Mass.
14. Palmieri, F., Prezioso, G., Quagliariello, E. und Klingenberg, M., (1971) Europ. J. Biochemistry 22 (66)
15. Quagliariello, E., Palmieri, F., (1972) in Bioch. and Biophys. of mitochondrial membranes (G.F. Azzone et al. eds) 659; Academic Press, New York and London
16. Santarius, K.A., Stocking, C.R., (1969) Z. Naturforschung 246 (1170)
17. Strotmann, H., Murakami, S., (1976) in Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Vol. 3 (R. Stocking, U. Heber eds) im Druck; Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York
18. Werdan, K., Heldt, H.W., Milovancev, M., (1975) Biochim. et Biophys. Acta 396 (276)
19. Werdan, K., (1975) Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität München
20. Whatley, F.R., Arnon, D.J., (1963) Methods Enzym. 6 (308)

Lebenslauf

Ich, Karl Bernhard Lehner, wurde am 29. Januar 1950 als siebtes Kind des Stadtarbeiters Georg Lehner und seiner Ehefrau Barbara in Regensburg geboren. Im September 1956 trat ich in die Volksschule ein, von welcher ich im September 1960 in das humanistische Alte Gymnasium Regensburg überwechselte. Im Juli 1969 bestand ich das Abitur und begann im November des gleichen Jahres mit dem Medizinstudium in München, wo ich bis zum Abschluß meines Studiums verblieb. Im Oktober 1970 legte ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung, im April 1972 die Ärztliche Vorprüfung und im Juni 1975 die Ärztliche Prüfung ab. Im Juni 1974 heiratete ich. Zur Zeit bin ich als Medizinalassistent am Elisabeth-Krankenhaus Straubing tätig.

